

O Glucagon na Diabetes Tipo 1 e o seu Potencial Terapêutico

João Filipe Figueiral Oliva Soares Alves

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM **MEDICINA**

Orientador: Professor Doutor Rui Carvalho

Porto, 2017

Glucagon na Diabetes Tipo 1 e o seu Potencial Terapêutico

Artigo de Revisão Bibliográfica

Autor: João Filipe Figueiral Oliva Soares Alves Estudante do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina no Instituto De Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto, Portugal, contacto: Joao.alves8d@gmail.com

Orientador: Dr. Rui Carvalho Assistente Graduado de Endocrinologia do Centro Hospitalar do Porto, Professor Auxiliar Convidado de Endocrinologia da Disciplina de Clínica Médica do Mestrado Integrado em Medicina no Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto, Portugal

RESUMO

A Diabetes Tipo 1 (DT1) é uma doença autoimune, crónica, progressiva, que acarreta uma elevada morbimortalidade. Caracteriza-se por níveis elevados de glicose no sangue devido à incapacidade progressiva de produzir insulina, ocasionada pela destruição parcial ou total das células β pancreáticas. Os elevados níveis de glicose podem conduzir a complicações multissistémicas, a nível microvascular e macrovascular, e conduzir a uma morte prematura. É, portanto, fundamental um bom controlo glicémico para a prevenção destas complicações.

A insulina, desde a sua descoberta em 1921, é considerada o mais importante regulador metabólico, sendo o seu défice responsável pelos distúrbios catabólicos da doença: a visão insulino-cêntrica da Diabetes. Contudo, na DT1, para além do défice de insulina, verifica-se uma hiper-glucagonemia que estimula a produção de glicose e a cetogénese hepática, induzindo consequentemente hiperglicemia. Por outro lado, ocorre uma perda da secreção de glucagon como resposta à hipoglicemia, o que conduz a hipoglicemias recorrentes que contribuem para a morbilidade da doença. Esta desregulação da secreção do glucagon é explicada pela evidência de que a secreção de glucagon pela célula α é regulada de forma parácrina pela insulina, cuja produção pelas células β está comprometida.

Atualmente, a terapêutica DT1 centra-se na administração de insulina, negligenciando o excesso de glucagon. No entanto, a monoterapia insulínica tem uma eficácia limitada e está associada a uma grande variabilidade glicémica, o maior desafio do controlo metabólico da DT1.

A presente dissertação tem como principal objetivo a revisão da evidência existente acerca do papel do glucagon na patogénese da DT1 e explorar o seu potencial terapêutico, através da inibição da sua secreção pela célula α ou da supressão sua ação, bem como, da infusão pontual de glucagon durante a hipoglicemia, com o intuito de complementar a monoterapia insulínica e melhorar o controlo glicémico.

Palavras chave: Diabetes Tipo 1, glucagon, célula α , célula β , hiper-glucagonemia, hiperglicemia, hipoglicemia, variabilidade glicémica, inibição da secreção do glucagon.

ABSTRACT

Type 1 Diabetes is a chronic, progressive, autoimmune disease responsible for high morbidity and mortality worldwide. It is characterized by elevated blood glucose levels due to the progressive inability to produce insulin, caused by partial or total destruction of pancreatic β -cells. Elevated blood glucose levels can lead to multi-systemic complications at micro and macrovascular levels and lead to premature death. Thus, a good glycemic control is essential to prevent its complications.

Insulin, since its discovery in 1921, is considered the most important metabolic regulator and its deficit is responsible for the catabolic disorders of the disease: insulinocentric vision of Diabetes. However, in Type 1 Diabetes, in addition to the insulin deficit, there is hyperglucagonemia that stimulates hepatic glucose production and ketogenesis, consequently inducing hyperglycemia. On the other hand, there is a loss of glucagon secretion in response to hypoglycaemia, which leads to recurrent hypoglycemia contributing to disease morbidity. This deregulation of glucagon secretion is explained by the evidence that glucagon secretion is regulated by β -cell production of insulin, which is compromised in Type 1 Diabetes.

Currently, Type 1 Diabetes therapy focuses on insulin delivery, neglecting the excess of glucagon. However, insulin monotherapy has limited efficacy and is associated with high glycemic lability, the most challenging problem in the metabolic control of Type 1 Diabetes.

The current dissertation aims to review the evidence on the role of glucagon in the pathogenesis of Type 1 Diabetes and to explore its therapeutic potential through inhibition of glucagon secretion by α cell or suppression of its action, as well as by glucagon punctual infusion during hypoglycemia, in order to complement insulin monotherapy and improve glycemic control.

Keywords: Type 1 Diabetes Mellitus, glucagon, α cell, β cell, hyperglucagonemia, hyperglycemia, hypoglycemia, glycemic lability, inhibition of glucagon secretion.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar o meu sincero agradecimento ao Dr. Rui Carvalho por toda a disponibilidade e colaboração na orientação científica e revisão de conteúdos ao longo da realização da presente dissertação.

LISTA DE ABREVIATURAS

DT1 - Diabetes tipo 1

DT2 – Diabetes tipo 2

PPH – polipéptido pancreático humano

GLP-1 – péptido semelhante ao glucagon 1

GABA - ácido gama-aminobutírico

GIP - péptido insulínico dependente da glicose

LDL - lipoproteína de baixa densidade

(Gcgr^{-/-}) – recetor do glucagon nulo

mAb – anticorpos monoclonais

siRNA – small interfering RNA

ÍNDICE

Resumo	2
Abstract.....	3
Agradecimentos	4
Lista de abreviaturas	5
Índice	6
Introdução e objetivos	7
Material e Métodos	9
Resultados e discussão	10
1. Regulação parácrina da secreção do glucagon	10
2. A hiperglucagonemia na fisiopatologia da DT1	13
3. Glucagon e Hipoglicemia na DT1	16
4. Glucagon e a variabilidade glicêmica na diabetes Tipo 1	18
5. Supressão do glucagon como estratégia terapêutica na DT1	19
5.1 Inibidores da secreção de glucagon.....	19
5.2 Antagonismo da ação do glucagon.....	23
6. Restauração da contrarregulação da glicose	25
7. Terapia Bihormonal: infusão ou supressão do glucagon?	27
Conclusão	28
Referências	30

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A Diabetes é uma doença crónica e progressiva, que acarreta uma elevada morbimortalidade a nível mundial. A Diabetes Tipo 1 (DT1) é um dos dois tipos de Diabetes e é geralmente precipitada por uma destruição autoimune das células β pancreáticas produtoras de insulina, o que se reflete em níveis elevados de glicose plasmática (1, 2). Embora a DT1 possa ser diagnosticada a qualquer idade, continua a ser uma das mais comuns doenças crónicas da infância. A incidência de DT1 varia substancialmente a nível global, no entanto tem vindo a aumentar durante as últimas décadas. Se as incidências regionais continuarem a aumentar, a incidência global poderá duplicar na próxima década (3).

Os níveis elevados de glicose plasmática podem conduzir a complicações multissistémicas, com atingimento micro e macrovascular, podendo levar a uma morte prematura. As complicações incluem retinopatia, insuficiência renal, neuropatia com perda sensibilidade e lesão dos membros, doença cardíaca isquémica, doença cerebrovascular e doença arterial periférica. A doença cardiovascular tem-se tornado a complicação macrovascular mais frequente, à medida que a esperança média de vida de pessoas com DT1 aumenta. Indivíduos com DT1 têm 10 vezes mais risco de desenvolver eventos cardiovasculares do que a população não diabética (4). Estas complicações têm importantes repercussões na qualidade de vida dos doentes e grande impacto económico no doente e na sua família, bem como nos sistemas de saúde e economias nacionais. Dado o seu crescente impacto na saúde pública, é fundamental a continuação e expansão da investigação e desenvolvimento de novas terapêuticas na DT1, que melhorem o controlo glicémico no sentido de prevenir as suas graves complicações.

Embora a patogénese da Diabetes ainda não esteja totalmente esclarecida, destaca-se o papel principal de duas hormonas reguladoras da glicose com funções opostas: a insulina e o glucagon. A insulina, desde a sua descoberta em 1921, é considerada o mais importante regulador metabólico, estando o seu défice ligado aos distúrbios catabólicos da doença: a correção da insulinopenia é a base da visão insulinocêntrica da Diabetes, que persistiu ao longo dos últimos 90 anos. Contudo, a literatura atual sugere que o glucagon tem um papel central na patogénese da doença. O glucagon faz parte do sistema hormonal de homeostasia da glicose que previne a hipoglicemia, atuando exclusivamente no fígado,

onde estimula a glicogenólise, a gliconeogénese e a cetogénese. A literatura revelou que a produção de glucagon pelas células α é regulada pela insulina através de um mecanismo parácrino intra-ilhéus. Uma vez que a produção de insulina está comprometida na DT1, ocorre uma desregulação da secreção de glucagon que está diretamente relacionada com os principais sintomas de DT1.

Atualmente, a terapêutica da DT1 centra-se na administração de insulina, negligenciando-se os defeitos da secreção de glucagon. Desta forma, a monoterapia com insulina tem uma eficácia limitada e está associada a uma grande variabilidade glicémica, o maior desafio do controlo metabólico da DT1. Mesmo doentes com ótimo controlo metabólico apresentam níveis de glicose plasmática pós-prandiais 3 a 4 vezes o normal, razão pela qual uma hemoglobina glicada inferior a 6% é tão rara nos doentes com DT1 (5).

A presente dissertação tem como principal objetivo a revisão da evidência existente acerca do papel do glucagon na patogénese da DT1 e explorar o seu potencial terapêutico. Neste sentido, serão discutidas estratégias terapêuticas como a supressão da hiperglucagonemia através da inibição da sua secreção ou antagonismo da sua ação, bem como a sua infusão pontual durante a hipoglicemia, com vista a complementar a monoterapia insulínica e assim otimizar o controlo glicémico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi efetuada uma revisão da literatura acerca do papel do glucagon na fisiopatologia da DT1 e o seu potencial como alvo terapêutico, recorrendo à pesquisa de artigos científicos publicados no período entre 1961 e 2016. A pesquisa incluiu também a análise de artigos que constavam das referências bibliográficas dos estudos incluídos. A pesquisa bibliográfica foi realizada nas seguintes bases de dados: PubMed, Scopus e Web of Science.

Os artigos foram selecionados conforme o conteúdo do título e/ou resumo, privilegiando artigos mais recentes. Contudo, foram incluídos artigos mais antigos pela sua importância histórica na investigação do papel do glucagon na DT1. A análise bibliográfica foi limitada a trabalhos publicados na língua inglesa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Regulação parácrina da secreção do glucagon

O mecanismo subjacente à regulação da secreção de glucagon tem suscitado grande debate na comunidade científica desde 1970. A regulação da secreção de glucagon pela célula α é influenciada por nutrientes, hormonas, neurotransmissores e fármacos, sendo dotada de grande complexidade. Esta regulação envolve sinalização direta pelas células α (6), sinalização parácrina e endócrina pelos produtos segregados pelas células β (7) e δ (8), o sistema nervoso autónomo, incretinas intestinais e um conjunto de sinais autócrinos (9). Atualmente, existe uma vasta investigação que favorece a hipótese parácrina, tendo esta especial importância na fisiopatologia da diabetes.

A regulação parácrina do glucagon é suportada pela anatomia do pâncreas humano, que facilita a exposição da célula α a fatores inibitórios produzidos pelas células δ e β (10).

As células δ produzem uma hormona designada somatostatina, uma inibidora potente da secreção de glucagon e insulina (11). A somatostatina, quando infundida em cães com diabetes induzida por estreptozocina ou em diabéticos tipo 1, suprimiu a hiperglucagonemia característica da doença (12, 13). Por outro lado, o antagonismo do recetor da somatostatina aumentou a resposta do glucagon à hipoglicemia em ratos diabéticos induzidos por estreptozocina (14).

Vários produtos das células β parecem estar implicados na regulação parácrina das células α , nomeadamente a insulina, o zinco, o GABA e a amilina. Existe evidência de que a regulação das células α pelas células β , que ocorre através de um mecanismo de sinalização indireta e recíproca, predomina em relação à sinalização direta das células α (15-19).

A insulina é uma hormona com efeito fisiológico oposto ao glucagon a nível da glucorregulação hepática. O desenvolvimento de radioimunoensaios altamente específicos permitiu verificar que a secreção de insulina e de glucagon varia de forma recíproca: durante a glicopenia os níveis de insulina diminuem e os de glucagon

aumentam, enquanto que durante a administração de glicose os níveis de insulina aumentam e os glucagon diminuem. (20, 21) A natureza recíproca da secreção destas hormonas é responsável pela manutenção da glicemia e concordante com os resultados de vários estudos que demonstraram que a insulina inibe, através de um mecanismo parácrino intra-ilhéus, a secreção de glucagon. (15-19)

A hipótese da regulação parácrina do glucagon pela insulina e outros produtos da célula β é favorecida pela citoarquitetura única do pâncreas. (10) Estudos sobre a microvasculatura dos ilhéus sugerem que as células α se encontram a jusante das células β . Consequentemente, a insulina parácrina atinge as células α antes de ser distribuída pelo restante organismo em concentrações muito acima dos níveis endócrinos de insulina nos tecidos e órgãos periféricos. Verificou-se que um núcleo de células β nos ilhéus está rodeado por uma fina camada de células α e células δ , existindo assim uma extensa justaposição de células α e β , que permite que a insulina alcance as células α através do seu interstício comum. (10, 22-24) Além disso, o recetor da insulina e as suas moléculas sinalizadoras são altamente expressas na célula α . O papel fundamental da insulina na modulação da célula α é confirmado pelo facto de o *knockdown* dos recetores de insulina na célula α (mediado por *small interfering RNA*) abolir a regulação do glucagon pela glicose. Outro estudo demonstrou que o bloqueio da via de sinalização da insulina com um inibidor fosfatidilinositol 3-quinase (wortmannin) anulou a supressão de glucagon pela elevação da glicose plasmática, sem que a secreção de insulina tenha sido afetada, confirmando que a via de sinalização da insulina medeia a supressão do glucagon induzida pela glicose. (25, 26) Também se verificou que a perfusão de pâncreas de ratos (27) e humanos (11) com um anticorpo anti-insulina aumentou imediatamente a libertação de glucagon. Estes achados apoiam um mecanismo de regulação parácrina que explica a reciprocidade entre a secreção de glucagon e insulina em resposta às variações de glicose (21). Desta forma, a hiperglucagonemia verificada na DT1 pode resultar da perda da supressão do glucagon pela insulina a nível intra-ilhéus (21). Esta hipótese foi testada num estudo recente com porcos tratados com aloxano, um químico que destrói seletivamente as células β induzindo hiperglicemia. Nos porcos tratados com este fármaco perdeu-se a supressão do glucagon pós-prandial, enquanto que nos porcos não tratados a insulina pós-prandial induziu a supressão do glucagon (28).

Os defeitos da resposta do glucagon à hipoglicemia verificados na DT1 apoiam também a regulação parácrina, que nestes indivíduos está comprometida. A hipoglicemia é uma complicação grave da DT1. Em indivíduos saudáveis, a resposta do glucagon à hipoglicemia é desencadeada pela diminuição dos níveis de insulina intra-ilhéus. A ausência desta resposta na DT1 explica de forma plausível a perda do mecanismo de contrarregulação da glicose (19). Assim, uma menor diminuição dos níveis de insulina intra-ilhéus durante hipoglicemia reduz a resposta do glucagon (18, 19). A corroborar esta hipótese, a amplificação da diminuição de insulina intra-ilhéus aumenta o incremento de glucagon circulante durante uma hipoglicemia na DT2 avançada (29). Estes achados reforçam a importância da insulina na regulação parácrina da secreção de glucagon.

Outro produto de secreção das células β é o zinco. Pelo facto de o zinco se ligar à insulina e ser co-secretado com esta pelas células β , o seu possível papel na regulação das células α tem vindo a ser investigado. Um estudo relatou que a interrupção da infusão arterial no pâncreas de insulina que continha zinco, bem como, da infusão de cloreto de zinco, promovia o aumento da secreção de glucagon em ratos diabéticos. No entanto, a interrupção da infusão de insulina sem zinco não teve este efeito. Estes achados conduziram os autores a concluir que o zinco era o produto de secreção das células β que inibia o glucagon, e não a insulina (30). Contudo, vários estudos demonstraram o contrário: que a insulina *per se* (sem zinco), e não o zinco sem insulina, regulava o glucagon (17, 31). Estes achados contraditórios sugerem que o zinco, para além da insulina, poderá ter um papel na complexa regulação do glucagon.

O mecanismo através do qual a insulina inibe a secreção de glucagon ainda não foi completamente esclarecido. Pensa-se que a insulina e o zinco inibam a atividade elétrica da célula α e a secreção de glucagon através de um mecanismo de sinalização que conduz à ativação dos canais de potássio sensíveis ao ATP e à consequente hiperpolarização da membrana (32). Contudo, existe também evidência de que a insulina induz a translocação dos recetores GABA_A na célula α via um mecanismo dependente do Akt cinase. Estes recetores são ativados pelo GABA, que constitui também um produto de secreção das células β , conduzindo à hiperpolarização da membrana celular e consequente inibição direta da secreção de glucagon (26, 33).

Dados surpreendentes de estudos recentes sugerem ainda que a insulina poderá inibir a secreção de glucagon através de uma ação no hipotálamo ventromedial (34, 35).

2. A hiperglucagonemia na fisiopatologia da DT1

Na DT1 verifica-se uma perturbação do equilíbrio hormonal entre a insulina e o glucagon, no qual a deficiência relativa ou absoluta de insulina, ocasionada pela destruição autoimune das células β , se associa a uma hiperglucagonemia tanto em jejum como pós-prandial (21, 36). A semelhança entre os efeitos do glucagon a nível hepático (indução de gliconeogénese, glicogenólise e cetogénese) e os distúrbios catabólicos da DT1 sugeriram que esta hormona poderia contribuir para a sua fisiopatologia

Com efeito, verificou-se que os níveis absolutos de glucagon e o rácio de glucagon-insulina na veia porta hepática estão frequentemente elevados na diabetes em animais e seres humanos, (21) e que a hiperglucagonemia está associada à indução e manutenção da hiperglicemia (12). Assim se deduz que a hiperglicemia que caracteriza o fenótipo da DT1 pode resultar, não só do défice de insulina, mas também da ausência de supressão da secreção de glucagon pela insulina, como referido anteriormente (37).

Deste modo, o excesso de glucagon tem um papel essencial na patogénese da diabetes ao induzir hiperglicemia, pelo que a sua supressão deve reduzir a glicemia. Esta hipótese pôde ser explorada, quando Koerker et al (1974) revelou que a infusão de somatostatina poderia inibir a produção de glucagon (38). No seguimento desta descoberta, quando foi infundida somatostatina em cães com défice de insulina (induzido por aloxano ou pancreatectomia total) (39) ou em humanos, como primeiramente demonstrado por Gerich et al (13, 36), verificou-se uma diminuição da hiperglucagonemia e uma redução marcada da glicemia, mesmo com redução ou descontinuação da insulina. Aliada a estes achados, a infusão de glucagon exógeno restaurou a hiperglicemia.

A constatação de evidência de que na DT1 a secreção de glucagon estava aumentada e associada a hiperglicemia levou Unger e Orci em 1975 a propor a “Hipótese Bihormonal”. Segundo esta, os diferentes distúrbios metabólicos da Diabetes são causados pelo défice absoluto ou relativo de insulina (diminuição da utilização de glicose, lipólise e proteólise aumentadas) e pelo excesso de glucagon (aumento a nível hepático da glicogenólise, gliconeogénese, cetogénese e diminuição da glicogénese) (40).

Um estudo recente de Lee Y et al (2011), que conta com a co-autoria de Unger, reforça o papel do glucagon como mediador das consequências metabólicas da falta de insulina. Neste estudo, realizado em ratos *knockout* para os recetores do glucagon (*Gcgr*-/-) e portanto sem resposta ao glucagon, a destruição total das células β não resultou nos defeitos metabólicos típicos da Diabetes, isto é, hiperglicemia ou hipercetonemia. Já, em ratos normais, a destruição das células β resultou nas consequências metabólicas da DT1, culminando com morte passadas 6 semanas, devido a cetoacidose. O mais surpreendente foi a observação de que os ratos *knockout* (*Gcgr*-/-) mantiveram resultados normais nos testes de tolerância à glicose oral e intraperitoneal, apesar da destruição virtualmente total das células β e, conseqüente, déficit de insulina. Uma vez que um teste de tolerância à glicose normal exclui o diagnóstico de Diabetes, conclui-se que o fenótipo diabético não se pode manifestar sem a ação do glucagon, pelo menos no rato. Deste modo, no rato, os distúrbios do metabolismo da glicose e da cetogénese associados à DT1 são mediados pela hipersecreção de glucagon e não somente pela déficit de insulina (41). Se estes achados se estenderem ao ser humano, como é sugerido pelos estudos com somatostatina de Gerich et al (13) e Ranskin e Unger (36), o excesso de glucagon poderia estar associado ao distúrbio catabólico verificado na DT1. Contudo, atualmente não existe evidência que possa questionar que a proteólise e lipólise aumentadas em doentes com DT1 não controlada são causadas unicamente pela falta de insulina. Com efeito, não se conhecem recetores do glucagon no músculo (42). Desta forma, ainda não está esclarecida a razão pela qual o déficit de insulina nos ratos (*Gcgr*-/-) parece não alterar o metabolismo da massa adiposa e do músculo. Foram colocadas algumas hipóteses para explicar como a deleção do recetor do glucagon pode, assim, colmatar a necessidade de insulina para estimular a utilização de glicose periférica. Uma das hipóteses é que o bloqueio da ação do glucagon possa induzir uma utilização maior que o normal de glicose pelo fígado e, deste modo, compensar o déficit de glicose a nível muscular. Alternativamente, podem ter ocorrido mudanças adaptativas ao nível do músculo que permitam a utilização de glicose de forma não dependente da insulina (42). Esta hipótese é apoiada pela demonstração de que a tolerância à glicose não foi alterada num rato com *knockout* do recetor de insulina específico do músculo (43). De igual forma, a tolerância à glicose manteve-se normal em ratos com o GLUT4 nulo, parecendo existir uma compensação por um transportador de glicose independente da insulina. No entanto, no cão e no homem, quando a insulina e o glucagon foram inibidos simultaneamente pela administração de somatostatina, ocorreu uma diminuição da *clearance* de glicose e um

aumento marcado da glicemia. Assim, não obstante o papel do glucagon nos distúrbios metabólicos da DT1, o efeito da insulina na utilização de glicose, mesmo perante um défice de glucagon, é aparentemente essencial em mamíferos superiores (44, 45).

Vários estudos foram realizados para clarificar o desequilíbrio bihormonal pós-prandial na DT1. Nesta doença, a resposta do glucagon à ingestão de uma refeição de hidratos de carbono está claramente alterada, diferindo acentuadamente de um não diabético em que o aumento das concentrações de glicose está associado a uma diminuição do glucagon plasmático. No grupo diabético, além da diminuída ou ausente secreção de insulina, a normal diminuição do glucagon não se verifica. Dinneen S, et al. (1995) demonstraram que a falta de supressão do glucagon, após uma refeição de hidratos de carbono, induz produção hepática de glicose (46). Aliás, em doentes com DT1, a administração de glicose pode mesmo estimular paradoxalmente a secreção de glucagon, independentemente da glicemia inicial do indivíduo. Esta resposta anormal do glucagon contribui para a hiperglicemia pós-prandial na DT1 (47). Estes resultados sugerem que após a administração de glicose, a supressão do glucagon não é causada pela hiperglicemia, mas provavelmente pela elevação dos níveis de insulina.

Em diabéticos tipo 1 existe também uma resposta exagerada das células α à ingestão de aminoácidos, demonstrada pelo facto de a perfusão do pâncreas do rato com arginina estimular a produção de glucagon (48). Num estudo recente em crianças diabéticas, recentemente diagnosticadas num período até 6 semanas, a secreção de glucagon, em resposta a uma refeição mista com alto teor de proteína, aumentou 37% ao longo de 12 meses, enquanto que a secreção de péptido C diminuiu 45%. A variação da secreção de glucagon e péptido C em direcções opostas remete para o desequilíbrio bihormonal, com uma secreção aumentada de glucagon a acompanhar a decrescente função das células β (49). Um estudo semelhante em crianças diabéticas com diagnóstico da doença até dois anos demonstrou resultados semelhantes. (50). Assim, a hiperglucagonemia verificada em diabéticos após a ingestão de uma refeição mista com alto teor de proteína pode causar uma amplificação da hiperglicemia pós-prandial.

Estes achados fornecem ampla evidência de que o glucagon tem um importante papel na fisiopatologia da DT1 e colocam em causa o dogma do insulino-centrismo. Torna-se assim possível afirmar que, para além do défice de insulina, o excesso de glucagon está envolvido nos distúrbios catabólicos associados à DT1.

3. Glucagon e Hipoglicemia na DT1

A hipoglicemia iatrogénica é uma realidade no dia-a-dia de um doente com DT1, que necessita de terapêutica insulínica, constituindo o principal fator limitante do controlo glicémico da Diabetes. (51) A hipoglicemia iatrogénica é uma causa importante de morbilidade recorrente na maior parte dos diabéticos tipo 1, podendo mesmo ser fatal (52). As sucessivas hipoglicemias enfraquecem os mecanismos de defesa fisiológicos subsequentes à diminuição da concentração de glicose plasmática e podem causar, assim, um ciclo vicioso de hipoglicemias recorrentes.

Os mecanismos fisiológicos de defesa contra a hipoglicemia são: diminuição da secreção de insulina, aumento da secreção de glucagon e, na ausência destes, aumento da secreção de adrenalina pelas suprarrenais. O mecanismo de defesa comportamental é a ingestão de hidratos de carbono desencadeado por sintomas que permitem o reconhecimento da hipoglicemia pelo indivíduo, tendo estes origem no sistema nervoso simpático e suprarrenais (53-55).

A hipoglicemia na DT1 é fundamentalmente iatrogénica, resultando da hiperinsulinemia terapêutica que, perante o compromisso endógeno dos mecanismos de defesa contra a hipoglicemia, conduz à diminuição dos níveis de glicose plasmática. (56) Dado que a insulina é administrada exogenamente na DT1, não ocorre diminuição dos níveis de insulina intra-ilhéus e periférica paralelamente à diminuição da glicemia, perdendo-se assim o primeiro mecanismo de defesa contra a hipoglicemia. Além deste, perde-se o segundo mecanismo, visto que os níveis de glucagon não aumentam com a descida da glicose plasmática. Esta disfunção das células α pode estar associado à falência das células β que assim deixam de regular parácrina e endócrinamente a produção de glucagon através da diminuição da secreção de insulina. São a favor desta hipótese o facto de um aumento na secreção de glucagon poder ser desencadeado pela diminuição da insulina exógena na DT1 durante a hipoglicemia (17) e a correlação direta entre o grau de perda da resposta do glucagon e o grau de perda da secreção de insulina (57). A terceira defesa fisiológica pode também perder-se por atenuação da resposta do sistema nervoso simpático e da medula suprarrenal que resulta numa síndrome clínica de inconsciência de hipoglicemia e contrarregulação da glicose deficiente, designada por disautonomia associada à hipoglicemia (51, 56). Também a, já referida, observação de que níveis

elevados de insulina no cérebro podem inibir a secreção de glucagon através de um mecanismo neuronal reforça o papel da hiperinsulinemia iatrogénica na incidência elevada de hipoglicemia na DT1 (34, 35).

Infelizmente, a maior barreira para um controlo glicémico intensivo são as hipoglicemias. A perda da diminuição da secreção de insulina e da resposta do glucagon durante a hipoglicemia ocorrem precocemente na evolução da doença, pelo que a hipoglicemia cedo se torna um problema clínico recorrente na DT1. A eliminação da hipoglicemia na vida dos diabéticos tipo 1 impõe novos métodos de tratamento que permitam a administração de insulina regulada pela glicose de forma precisa e a restauração do mecanismo de contrarregulação da hipoglicemia (51).

4. Glucagon e a variabilidade glicémica na diabetes Tipo 1

A variabilidade glicémica é o problema mais desafiante no controlo diário da DT1. Os doentes com DT1 devem monitorizar constantemente os níveis de glicose sanguínea, de forma a corrigir flutuações glicémicas significativas com a administração de glicose ou insulina suplementar, afetando profundamente a qualidade de vida do paciente. A relação causal entre a variabilidade glicémica e a perda da regulação parácrina dos ilhéus pela insulina é muito plausível.

A variabilidade glicémica parece resultar, em parte, do comportamento paradoxal das células α face às variações glicémicas. Um exemplo deste comportamento é a estimulação paradoxal da secreção de glucagon que ocorre após a administração de glicose, que por sua vez aumenta a produção hepática de glicose, amplificando a hiperglicemia pós-prandial em diabéticos (47). Este comportamento pode ser atribuído ao facto de a supressão das células α a nível parácrino requerer níveis de insulina muito superiores aos necessários para a regulação da glicose nos tecidos e órgão periféricos. Isto significa que as células α hipersecretoras não podem ser suprimidas pela insulina injetada, pois o atingimento destas concentrações a nível pancreático implicaria uma hiperinsulinização dos tecidos extrapancreáticos com a consequente inevitável hipoglicemia.

Por outro lado, dado que na monoterapia insulínica não ocorre uma diminuição da insulina perante a descida da glicemia, o aumento do glucagon fisiológico que reverte a hipoglicemia em não diabéticos não ocorre (51). Na DT1, a contrarregulação da hipoglicemia disfuncional pode ainda ser agravada por neuropatia autonómica, atenuando a resposta das células α à hipoglicemia mediada pelo sistema nervoso simpático e suprarrenais (51, 58).

A disfunção da célula α pode assim conduzir a grandes amplitudes glicémicas. Uma vez que a hemoglobina glicada reflete a média de glicemias, esta pode estar ilusoriamente normal mesmo na presença de grandes oscilações glicémicas, não sendo representativa de um bom controlo metabólico do indivíduo. Não obstante, as hiperglicemias e hipoglicemias recorrentes terão as suas repercussões com atingimento de órgão alvo e consequente aumento da morbilidade e mortalidade (5, 59).

5. Supressão do glucagon como estratégia terapêutica na DT1

Se a hipersecreção de glucagon é de facto uma causa direta dos defeitos metabólicos da DT1, incluindo a variabilidade glicémica, a supressão de glucagon apresenta-se como uma estratégia terapêutica promissora para o controlo glicémico.

A variabilidade glicémica verificada na monoterapia insulínica pode resultar da diferença de concentrações de insulina requeridas pelos vários alvos desta hormona. Em indivíduos normais a citoarquitetura do pâncreas permite que as células α sejam expostas a concentrações de insulina 100 vezes superior à do músculo esquelético. (10, 24) Contudo, a insulina exógena usada no tratamento da DT1 atinge concentrações semelhantes em todos os tecidos, sendo insuficiente a nível intra-ilhéus, para suprimir a hipersecreção de glucagon, e artificialmente excessiva a nível dos tecidos periféricos (60).

A solução pode assentar na administração de insulina em doses que satisfaçam as necessidades dos tecidos periféricos e simultaneamente, em abordagens que suprimam a hiper glucagonemia por inibição da célula α ou por antagonismo da ação do glucagon. De seguida, serão descritos alguns agentes não insulínicos inibidores da secreção da célula α : análogos sintéticos do GLP-1, da leptina e da amilina.

5.1 Inibidores da secreção de glucagon

Amilina

A amilina é uma hormona polipeptídica co-segregada pelas células β com a insulina em resposta ao estímulo de nutrientes (61). Na DT1 uma vez que ocorre destruição de células β existe um défice de amilina e insulina (62). A amilina, no período pós-prandial imediato, poderá ter como efeitos a supressão de glucagon e o atraso do esvaziamento gástrico. Ainda não está esclarecido se ambos os efeitos são independentes ou consequência um do outro (63, 64). O acetato de pramlintide é um análogo sintético equipotente da amilina, que demonstrou melhorar o controlo glicémico na DT1 e DT2. A utilização do acetato de pramlintide ocasiona uma melhoria do perfil glicémico principalmente ao nível das flutuações glicémicas pós-prandiais em relação à monoterapia insulínica, sem aumentar o risco de hipoglicemia grave ou de aumento de peso, desde que haja uma diminuição concomitante das doses de insulina (65, 66). Uma

meta análise recente sobre a eficácia do pramlintide revelou uma diminuição modesta dos níveis de hemoglobina glicada de 0.2% a 0.3% (67). A terapêutica adjuvante com pramlintide está também associada a uma maior sensação de bem-estar e satisfação quando comparada com a administração de placebo, segundo os resultados de um questionário específico de satisfação do tratamento (68). A diminuição das excursões glicémicas pós-prandiais está também associada a diminuição dos marcadores de stress oxidativo, como a nitrotirosina e o colesterol das LDL oxidadas, e a uma melhoria dos marcadores de risco vascular, como o peso e níveis de triglicerídeos plasmáticos (69, 70).

A terapêutica com pramlintide em doentes com DT1 está associada a efeitos laterais como náuseas, vómitos e hipoglicemia. O efeito clinicamente mais relevante é a hipoglicemia, que poderá ocorrer se não for reduzida a dose de insulina administrada (11, 66, 71).

Agonistas do péptido semelhante ao glucagon-1 (GLP-1)

O GLP-1 é uma hormona incretina segregada pelas células L na mucosa intestinal em resposta à ingestão de alimentos. O GLP-1 é rapidamente degradado por uma enzima designada dipeptidil peptidase 4 (DPP-4), sendo o seu tempo de semi-vida plasmática de 1 a 2 minutos (72, 73). Esta incretina tem várias ações a nível da regulação da glicose e do controlo do peso: aumenta a secreção de insulina induzida pela glicose, suprime a secreção de glucagon, atrasa o esvaziamento gástrico, reduz o apetite e promove a saciedade (74). Recentemente, foi sugerido que o GLP-1 tem também benefícios na função cardiovascular (75-77).

A aplicação clínica de vários agonistas do recetor do GLP-1 está atualmente a ser investigada (78). A sua eficácia e perfil de segurança levou a que, recentemente, duas combinações com rácios fixos de análogo de insulina basal com agonistas do recetor do GLP-1 para administração diária, através de uma injeção única, fossem aprovadas pela *European Medicines Agency* (79, 80) e pela *U.S Food and Drug administration* (81, 82) no tratamento da DT2. O facto de esta combinação ser administrada através de uma injeção única diária deverá aumentar a adesão terapêutica.

Existe uma ampla evidência de que os agonistas do GLP-1 melhoram o controlo glicémico e favorecem a perda de peso na DT2 (72, 74, 76, 77, 83). Os efeitos benéficos

a nível da função das células β demonstrados pelos agonistas GLP-1 em ratos poderão ter vantagens na DT1 precoce. A expansão da massa de células β residuais e a sua regeneração poderão atenuar a sua destruição autoimune e restaurar a secreção de insulina em fases precoces da DT1 (84). No entanto, a maior parte dos estudos não demonstrou efeitos significativos dos agonistas de GLP-1 na massa de células β na evolução da DT1 (85).

Vários estudos demonstraram efeitos benéficos do GLP-1 a nível da hiperglicemia pós-prandial em diabéticos, mesmo na ausência de insulina residual. Num estudo conduzido por Gutniak et al (1992), as excursões glicémicas pós-prandiais foram atenuadas quando a infusão de GLP-1 era combinada com insulina, diminuindo a necessidade desta última (86). Também um estudo em 8 indivíduos com DT1 e níveis residuais de péptido C, a infusão contínua de GLP-1, após uma refeição mista, praticamente anulou o aumento de glicose plasmática. Estes achados foram explicados pelo atraso do esvaziamento gástrico e diminuição da secreção de glucagon (87). Num outro estudo, conduzido pelo mesmo grupo de investigadores, em indivíduos com DT1 com diferentes taxas de secreção de insulina residual, a injeção de GLP-1 subcutâneo antes de uma refeição levou a uma diminuição da glicose pós-prandial e do polipéptido pancreático humano (PPH), marcador da atividade aferente vagal. Contudo, os níveis de glucagon e péptido C mantiveram-se semelhantes ao grupo de controlo, realçando o papel do esvaziamento gástrico na diminuição da hiperglicemia pós-prandial (88). Também na DT1 sem secreção residual de insulina endógena verificou-se uma diminuição da glicose plasmática pós-prandial, do PPH e do glucagon (89).

Assim, os efeitos benéficos dos agonistas do GLP-1 na DT1 avançada ou em estádios precoces tornam pertinente o seu uso no tratamento da DT1 em associação com a insulina.

Leptina

Estudos recentes demonstraram que a leptina é uma hormona supressora potente do glucagon (90-92). A administração de leptina recombinante, com baixa dose de insulina, em ratos com DT1 não controlada, reverteu o estado catabólico e mimetizou as ações anabólicas da insulina, normalizando a hemoglobina glicada com uma menor variabilidade glicémica. Este efeito foi atribuído à supressão tónica da

hiperglucagonemia, que eliminou a hiperglicemia, e permitiu a diminuição de 90% dos níveis de insulina, reduzindo a incidência de hipoglicemia (91). Este efeito foi também conseguido através da infusão de leptina em ratos no interior dos ventrículos cerebrais, sugerindo um mecanismo dependente do SNC (93, 94).

A terapêutica com leptina associou-se a três principais efeitos benéficos em relação à monoterapia com insulina. O primeiro foi uma marcada diminuição da massa gorda corporal e das concentrações tecidulares e plasmáticas de triglicerídeos e de ácidos gordos livres - efeitos estes que podem aumentar a sensibilidade à insulina. Em segundo lugar, verificou-se a diminuição da expressão de fatores de transcrição hipercolesterolémicos e lipogénicos, que podem conduzir a uma redução da prevalência de doença coronária na DT1 que, segundo alguns estudos, excede os 90% em doentes com mais de 55 anos. (95, 96) Finalmente, associou-se a uma redução central do apetite que poderá facilitar a adaptação do doente às restrições dietéticas fundamentais no controlo da Diabetes (91).

5.2 Antagonismo da ação do glucagon

O antagonismo da ação do glucagon, através de anticorpos monoclonais (mAb) contra esta mesma hormona ou do bloqueio do seu recetor, tem sido utilizado para estudar os efeitos do défice seletivo de glucagon. Contudo, dado o seu papel na fisiopatologia da DT1, estas estratégias neutralizadoras da ação do glucagon podem representar uma terapêutica atrativa na DT1.

O potencial terapêutico da imunoneutralização do glucagon foi confirmado em vários estudos realizados em ratos. Num estudo conduzido por Brand CL et al (1994), a administração de um mAb do glucagon de alta capacidade e alta afinidade aboliu completamente o efeito hiperglicemiante de glucagon exógeno em ratos normais. Em ratos com Diabetes moderada (induzida por estreptozocina) normalizou a glicemia pós prandial. No entanto, em ratos gravemente diabéticos não se verificou normalização da glicemia (97). Em outro estudo, a administração mAb do glucagon em ratos obesos (ob/ob) com DT2 conduziu a redução da área debaixo da curva de glicose após um teste de tolerância à glicose, redução da produção hepática de glicose e aumento da síntese de glicogénio hepático. O tratamento com mAb do glucagon diminuiu a glicose plasmática e os níveis de triglicéridos após 5 dias e diminuiu a hemoglobina glicada após 14 dias (98).

O antagonismo da ação do glucagon através do bloqueio do seu recetor como potencial abordagem da Diabetes suscitou o interesse de vários investigadores. Esta hipótese foi corroborada num estudo em que a administração de Cpd-A, um bloqueador potente e seletivo do recetor do glucagon, levou a uma diminuição sustentada da glicose plasmática, e a uma elevação moderada dos níveis de glucagon e GLP-1. Em outro estudo, foi desenvolvido um mAb humano inibidor do recetor do glucagon denominado REGN1193. A sua administração em ratos diabéticos obesos (ob/ob) diminuiu os níveis de glicose para níveis observados em ratos sem recetor do glucagon. Além destes achados, o REGN1193 associou-se a um aumento do glucagon circulante e do GLP-1, bem como, a uma expansão reversível da massa de células α pancreáticas. A sua administração em macacos normalizou a glicemia em jejum e a tolerância à glicose e aumentou os níveis circulantes de glucagon e aminoácidos. A sua administração foi mantida por 8 semanas, não tendo causado hipoglicemia ou aumento da massa de células α pancreáticas (99).

Os resultados dos estudos apresentados confirmam que o antagonismo da ação do glucagon pode reduzir a glicose plasmática em ratos obesos diabéticos com déficit parcial de insulina, confirmando o seu potencial no tratamento da DT2. Contudo, esta poderá também constituir uma estratégia promissora na DT1, demonstrou um estudo recente. O bloqueio da ação do glucagon com “mAb Ac”, um antagonista do recetor do glucagon, em ratos com DT1, manteve a glicose plasmática abaixo de 100mg/dL e a hemoglobina glicada abaixo de 4% mesmo sem a administração de insulina. (100)

Vários ensaios clínicos foram realizados para avaliar os efeitos dos bloqueadores do recetor do glucagon em humanos com DT2 (101-103). Apesar destes fármacos terem suprimido com sucesso os efeitos da hiperglucagonemia, o bloqueio dos recetores do glucagon tem algumas limitações, nomeadamente, efeitos laterais como hipertrofia das células α , elevação das transaminases hepáticas e aumento do colesterol LDL e total (103, 104). Desta forma, são necessários mais estudos para clarificar os seus riscos e benefícios.

6. Restauração da contrarregulação da glicose

Um dos desafios da terapêutica da DT1 é a melhoria da resposta à hipoglicemia. Neste sentido, a restauração dos mecanismos de contrarregulação da glicose tem sido alvo de investigação por vários estudos.

Reconhecendo que a somatostatina inibe o glucagon, dois estudos em roedores demonstraram que o antagonismo da somatostatina intra-ilhéus melhora a resposta do glucagon à hipoglicemia (14, 105). Também a administração de GIP parece melhorar a resposta do glucagon à hipoglicemia durante a fase de recuperação, diminuindo a necessidade de glicose (106). Outro estudo demonstrou ainda que o bloqueio parcial de recetores nicotínicos da acetilcolina pode melhorar a resposta à hipoglicemia num modelo de roedores com disautonomia associada à hipoglicemia (107).

Uma vez que na DT1 existe um défice de glucagon em momentos pontuais, a reposição de glucagon exógeno pode ser uma hipótese de controlo da hipoglicemia. El-Khabit et al tentaram estabilizar o controlo glicémico através de um sistema de pâncreas artificial “*closed loop*” que usa pequenas doses de glucagon com insulina, obtendo resultados promissores (108). Atualmente estão a ser desenvolvidas formulações de glucagon estáveis para infusão subcutânea e algoritmos de sistemas “*closed loop*” bi-hormonais estão a ser projetados e testados através de ensaios clínicos (109-119).

Bakhtiani PA et al analisaram os dados de 4 estudos em que foi testado o sistema “*closed loop*” para avaliar os fatores que determinam o sucesso da infusão de glucagon. Para tal, examinaram as variações glicémicas nos 50 minutos após a infusão de glucagon num grupo de 48 indivíduos com DT1. No total de 251 infusões de glucagon, o glucagon manteve, com sucesso, a glicose plasmática no intervalo alvo (60-180 mg/dl) em 78% dos casos, não sendo eficaz na evicção da hipoglicemia (<60 mg/dl) em 16% e da hiperglicemia subsequente (>180 mg/dl) em 6% dos casos. Da análise dos resultados, concluiu-se que o glucagon não é eficaz na evicção da hipoglicemia quando o limiar de glicose plasmática para a sua infusão é baixo ou quando a glicose baixa abruptamente (113). Em outro estudo foi quantificada a resposta glicémica a micro doses de glucagon subcutâneo, tendo-se concluído que a infusão de doses elevadas de insulina impede a

estimulação da produção hepática de glicose pelo glucagon, diminuindo desta forma, a sua eficácia na prevenção da hipoglicemia.

No entanto, a vantagem do uso de glucagon exógeno no sistema de pâncreas artificial não é clara. Um ensaio clínico randomizado comparou a eficácia do controlo glicémico entre três sistemas: o pâncreas artificial bihormonal com infusão de insulina e glucagon, o pâncreas artificial com infusão única de insulina e a bomba infusora de insulina convencional. Para este efeito, foi contabilizado o tempo em que a glicemia, monitorizada nos participantes ao longo de 24h, estava dentro de um intervalo alvo (4.0-10.0 mmol/L nas 2h após uma refeição e 4.0-8.0 mmol/L no restante tempo). Os autores concluíram que os dois sistemas de pâncreas artificial apresentavam eficácia semelhante, permitindo, ambos, um melhor controlo glicémico que a bomba de infusão de insulina convencional. (111).

7. Terapia Bihormonal: infusão ou supressão do glucagon?

O desequilíbrio entre os níveis de insulina e glucagon verificado na DT1 poderá beneficiar de uma estratégia de tratamento bihormonal, em que é adicionada uma segunda hormona à insulina para manipular a gluco-regulação hepática. Duas estratégias, já abordadas nos temas anteriores, foram sugeridas para colmatar os defeitos de secreção do glucagon. Uma é a supressão do glucagon pela inibição da sua secreção ou antagonismo da sua ação e a outra é a sua infusão pontual durante a hipoglicemia. Ambas as estratégias podem melhorar o controlo glicémico na DT1, contudo, necessitam de um sistema preciso e dinâmico em que a infusão de glucagon, ou de um seu inibidor, e de insulina se adapte à glicemia no momento. Este equilíbrio dinâmico poderá ser alcançado pelo sistema de pâncreas artificial “*closed loop*” em que a monitorização contínua dos níveis de glicose é integrada com a infusão de insulina e uma hormona adjuvante.

Decorre um debate sobre qual a estratégia mais efetiva nos sistemas “*closed loop*” bihormonais no controlo da DT1. A inibição do glucagon apresenta-se como vantajosa em relação à infusão de glucagon e, como tal, constitui a preferência dos autores (120). Tendo em consideração estudos *in vivo* (121, 122) e *in silico* (123, 124), as vantagens da supressão do glucagon incluem: (i) recuperação do equilíbrio entre insulina e glucagon; (ii) preservação das reservas de glicogénio hepático; (iii) redução da quantidade de insulina necessária para o controlo do sistema homeostático “*closed loop*”; (iv) utilização de glucagon endógeno, ao invés de glucagon exógeno, na proteção da hipoglicemia e potencial recuperação da contrarregulação do glucagon. A hipótese mais desafiadora é a possibilidade de a inibição do glucagon poder reparar a contrarregulação do glucagon disfuncional na DT1. Este conceito é baseado numa série de estudos *in vivo* (121, 122) e *in silico* (123, 124) que sugerem que a contrarregulação do glucagon em resposta à hipoglicemia é controlada por feedback. Segundo estes estudos, a correção da contrarregulação do glucagon durante a hipoglicemia pode ser potencialmente conseguida pela supressão basal do glucagon, em condições normais de normoglicemia, associada à suspensão desta supressão durante a hipoglicemia. A paragem de infusão do supressor do glucagon durante a hipoglicemia poderá desencadear uma resposta *rebound* do glucagon, estimulando a sua secreção de forma a promover a recuperação glicémica (120).

CONCLUSÃO

A monoterapia insulínica, praticada ao longo dos últimos 90 anos, parece estar longe de proporcionar um controlo glicémico estável e seguro em indivíduos com DT1. Este insucesso terapêutico da insulina justifica a continuação da investigação da fisiopatologia da Diabetes e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que permitam melhorar o controlo glicémico e, assim, diminuir a morbilidade e mortalidade associadas à DT1.

A variabilidade glicémica é o maior desafio no tratamento da DT1, estando intimamente associada à desregulação da célula α . Como tal, a modulação do glucagon apresenta-se como uma estratégia promissora, no sentido de otimizar o controlo glicémico. Atualmente, embora esta possibilidade terapêutica seja um tema de interesse crescente na comunidade científica, não existem fármacos aprovados no tratamento da DT1 que tenham como alvo a secreção de glucagon ou a sua ação.

Dado que a hiperglucagonemia típica da DT1 está associada à hiperglicemia, (40) a reversão da mesma através da inibição da célula α ou a supressão da ação do glucagon poderá reverter a instabilidade glicémica (41, 91, 100). Assim, esta estratégia poderá constituir uma terapêutica adjuvante fundamental para a estabilização glicémica na DT1.

Por outro lado, na DT1 não existe resposta do glucagon à hipoglicemia, que constitui um dos fatores limitantes mais importante no controlo glicémico (125). Assim sendo, a restauração da contrarregulação da glicose é uma abordagem terapêutica pertinente na DT1. Esta pode ser conseguida através do desenvolvimento de sistemas de pâncreas artificiais “closed loop” com infusão bihormonal de glucagon e insulina ou de um supressor do glucagon e insulina, ajustada de forma dinâmica às variações glicémicas. Tendo em conta a evidência existente, a utilização de supressores do glucagon apresenta-se como vantajosa em relação à infusão de glucagon. (120)

Ambas as abordagens de modulação do glucagon podem permitir, teoricamente, uma melhoria no rácio insulina glucagon na veia porta e corrigir os defeitos de contrarregulação da glicose durante a hipoglicemia. Todavia, convém enfatizar que a implementação de qualquer uma destas estratégias exige uma adaptação dinâmica e

precisa do glucagon e da insulina à glicemia, que provavelmente só poderá ser alcançada com o desenvolvimento de tecnologias como o pâncreas artificial. ´

Em suma, no futuro o tratamento da DT1 poderá beneficiar de um balanço preciso entre a modulação do glucagon e a administração de insulina, de forma a obter um equilíbrio hormonal o mais próximo possível do fisiológico, que se traduza num controlo glicémico adequado e na melhoria da qualidade de vida da pessoa com DT1.

REFERÊNCIAS

1. Todd JA. Etiology of type 1 diabetes. *Immunity*. 2010;32(4):457-67.
2. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*. 2010;464(7293):1293-300.
3. Dabelea D. The accelerating epidemic of childhood diabetes. *Lancet (London, England)*. 2009;373(9680):1999-2000.
4. Slim I. Cardiovascular risk in type 1 diabetes mellitus. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2013;17(Suppl1):S7-s13.
5. Derr R, Garrett E, Stacy GA, Saudek CD. Is HbA(1c) affected by glycemic instability? *Diabetes care*. 2003;26(10):2728-33.
6. Zhang Q, Ramracheya R, Lahmann C, Tarasov A, Bengtsson M, Braha O, et al. Role of K(ATP) Channels in Glucose-Regulated Glucagon Secretion and Impaired Counterregulation in Type 2 Diabetes. *Cell metabolism*. 2013;18(6):871-82.
7. Samols E, Marri G, Marks V. Interrelationship of glucagon, insulin and glucose. The insulinogenic effect of glucagon. *Diabetes*. 1966;15(12):855-66.
8. Hauge-Evans AC, King AJ, Carmignac D, Richardson CC, Robinson IC, Low MJ, et al. Somatostatin secreted by islet delta-cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function. *Diabetes*. 2009;58(2):403-11.
9. Cabrera O, Jacques-Silva MC, Speier S, Yang SN, Kohler M, Fachado A, et al. Glutamate is a positive autocrine signal for glucagon release. *Cell metabolism*. 2008;7(6):545-54.
10. Bosco D, Armanet M, Morel P, Niclauss N, Sgroi A, Muller YD, et al. Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes*. 2010;59(5):1202-10.
11. Brunnicardi FC, Kleinman R, Moldovan S, Nguyen TH, Watt PC, Walsh J, et al. Immunoneutralization of somatostatin, insulin, and glucagon causes alterations in islet cell secretion in the isolated perfused human pancreas. *Pancreas*. 2001;23(3):302-8.
12. Muller WA, Faloona GR, Unger RH. Hyperglucagonemia in diabetic ketoacidosis. Its prevalence and significance. *The American journal of medicine*. 1973;54(1):52-7.
13. Gerich JE, Lorenzi M, Bier DM, Schneider V, Tsalikian E, Karam JH, et al. Prevention of human diabetic ketoacidosis by somatostatin. Evidence for an essential role of glucagon. *The New England journal of medicine*. 1975;292(19):985-9.
14. Yue JTY, Riddell MC, Burdett E, Coy DH, Efendic S, Vranic M. Amelioration of Hypoglycemia Via Somatostatin Receptor Type 2 Antagonism in Recurrently Hypoglycemic Diabetic Rats. *Diabetes*. 2013;62(7):2215-22.
15. Banarer S, McGregor VP, Cryer PE. Intraislet hyperinsulinemia prevents the glucagon response to hypoglycemia despite an intact autonomic response. *Diabetes*. 2002;51(4):958-65.
16. Cooperberg BA, Cryer PE. Beta-cell-mediated signaling predominates over direct alpha-cell signaling in the regulation of glucagon secretion in humans. *Diabetes care*. 2009;32(12):2275-80.
17. Cooperberg BA, Cryer PE. Insulin Reciprocally Regulates Glucagon Secretion in Humans. *Diabetes*. 2010;59(11):2936-40.
18. Gosmanov NR, Szoke E, Israelian Z, Smith T, Cryer PE, Gerich JE, et al. Role of the decrement in intraislet insulin for the glucagon response to hypoglycemia in humans. *Diabetes care*. 2005;28(5):1124-31.
19. Raju B, Cryer PE. Loss of the decrement in intraislet insulin plausibly explains loss of the glucagon response to hypoglycemia in insulin-deficient diabetes: documentation of the intraislet insulin hypothesis in humans. *Diabetes*. 2005;54(3):757-64.

20. Unger RH, Eisentraut AM, McCall MS, Madison LL. GLUCAGON ANTIBODIES AND AN IMMUNOASSAY FOR GLUCAGON. *Journal of Clinical Investigation*. 1961;40(7):1280-9.
21. Unger RH. Glucagon physiology and pathophysiology in the light of new advances. *Diabetologia*. 1985;28(8):574-8.
22. Baetens D, Malaisse-Lagae F, Perrelet A, Orci L. Endocrine pancreas: three-dimensional reconstruction shows two types of islets of langerhans. *Science (New York, NY)*. 1979;206(4424):1323-5.
23. Bonner-Weir S, Orci L. New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes*. 1982;31(10):883-9.
24. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(7):2334-9.
25. Kaneko K, Shirotani T, Araki E, Matsumoto K, Taguchi T, Motoshima H, et al. Insulin inhibits glucagon secretion by the activation of PI3-kinase in In-R1-G9 cells. *Diabetes research and clinical practice*. 1999;44(2):83-92.
26. Xu E, Kumar M, Zhang Y, Ju W, Obata T, Zhang N, et al. Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABAA receptor system. *Cell metabolism*. 2006;3(1):47-58.
27. Maruyama H, Hisatomi A, Orci L, Grodsky GM, Unger RH. Insulin within islets is a physiologic glucagon release inhibitor. *The Journal of clinical investigation*. 1984;74(6):2296-9.
28. Meier JJ, Kjems LL, Veldhuis JD, Lefebvre P, Butler PC. Postprandial suppression of glucagon secretion depends on intact pulsatile insulin secretion: further evidence for the intraislet insulin hypothesis. *Diabetes*. 2006;55(4):1051-6.
29. Israelian Z, Gosmanov NR, Szoke E, Schorr M, Bokhari S, Cryer PE, et al. Increasing the decrement in insulin secretion improves glucagon responses to hypoglycemia in advanced type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2005;28(11):2691-6.
30. Zhou H, Zhang T, Harmon JS, Bryan J, Robertson RP. Zinc, not insulin, regulates the rat alpha-cell response to hypoglycemia in vivo. *Diabetes*. 2007;56(4):1107-12.
31. Ravier MA, Rutter GA. Glucose or insulin, but not zinc ions, inhibit glucagon secretion from mouse pancreatic alpha-cells. *Diabetes*. 2005;54(6):1789-97.
32. Franklin I, Gromada J, Gjiovci A, Theander S, Wollheim CB. Beta-cell secretory products activate alpha-cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release. *Diabetes*. 2005;54(6):1808-15.
33. Wendt A, Birnir B, Buschard K, Gromada J, Salehi A, Sewing S, et al. Glucose inhibition of glucagon secretion from rat alpha-cells is mediated by GABA released from neighboring beta-cells. *Diabetes*. 2004;53(4):1038-45.
34. Paranjape SA, Chan O, Zhu W, Horblitt AM, Grillo CA, Wilson S, et al. Chronic reduction of insulin receptors in the ventromedial hypothalamus produces glucose intolerance and islet dysfunction in the absence of weight gain. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2011;301(5):E978-83.
35. Paranjape SA, Chan O, Zhu W, Horblitt AM, McNay EC, Cresswell JA, et al. Influence of insulin in the ventromedial hypothalamus on pancreatic glucagon secretion in vivo. *Diabetes*. 2010;59(6):1521-7.
36. Raskin P, Unger RH. Hyperglucagonemia and its suppression. Importance in the metabolic control of diabetes. *The New England journal of medicine*. 1978;299(9):433-6.
37. Shah P, Basu A, Basu R, Rizza R. Impact of lack of suppression of glucagon on glucose tolerance in humans. *The American journal of physiology*. 1999;277(2 Pt 1):E283-90.
38. Koerker DJ, Ruch W, Chideckel E, Palmer J, Goodner CJ, Ensink J, et al. Somatostatin: hypothalamic inhibitor of the endocrine pancreas. *Science (New York, NY)*. 1974;184(4135):482-4.
39. Dobbs R, Sakurai H, Sasaki H, Faloona G, Valverde I, Baetens D, et al. Glucagon: role in the hyperglycemia of diabetes mellitus. *Science (New York, NY)*. 1975;187(4176):544-7.

40. Unger RH, Orci L. The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Lancet* (London, England). 1975;1(7897):14-6.
41. Lee Y, Wang MY, Du XQ, Charron MJ, Unger RH. Glucagon receptor knockout prevents insulin-deficient type 1 diabetes in mice. *Diabetes*. 2011;60(2):391-7.
42. Edgerton DS, Cherrington AD. Glucagon as a Critical Factor in the Pathology of Diabetes. *Diabetes*. 2011;60(2):377-80.
43. Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, Accili D, et al. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Molecular cell*. 1998;2(5):559-69.
44. Cherrington AD, Lacy WW, Chiasson JL. Effect of glucagon on glucose production during insulin deficiency in the dog. *The Journal of clinical investigation*. 1978;62(3):664-77.
45. Liljenquist JE, Mueller GL, Cherrington AD, Keller U, Chiasson JL, Perry JM, et al. Evidence for an important role of glucagon in the regulation of hepatic glucose production in normal man. *The Journal of clinical investigation*. 1977;59(2):369-74.
46. Dinneen S, Alzaid A, Turk D, Rizza R. Failure of glucagon suppression contributes to postprandial hyperglycaemia in IDDM. *Diabetologia*. 1995;38(3):337-43.
47. Kramer CK, Borgono CA, Van Nostrand P, Retnakaran R, Zinman B. Glucagon response to oral glucose challenge in type 1 diabetes: lack of impact of euglycemia. *Diabetes care*. 2014;37(4):1076-82.
48. Gerich JE, Charles MA, Grodsky GM. Characterization of the effects of arginine and glucose on glucagon and insulin release from the perfused rat pancreas. *The Journal of clinical investigation*. 1974;54(4):833-41.
49. Brown RJ, Sinaii N, Rother KI. Too much glucagon, too little insulin: time course of pancreatic islet dysfunction in new-onset type 1 diabetes. *Diabetes care*. 2008;31(7):1403-4.
50. Sherr J, Tsalikian E, Fox L, Buckingham B, Weinzimer S, Tamborlane WV, et al. Evolution of abnormal plasma glucagon responses to mixed-meal feedings in youth with type 1 diabetes during the first 2 years after diagnosis. *Diabetes care*. 2014;37(6):1741-4.
51. Cryer PE. The Barrier of Hypoglycemia in Diabetes. *Diabetes*. 2008;57(12):3169-76.
52. Cryer PE. Glycemic goals in diabetes: trade-off between glycemic control and iatrogenic hypoglycemia. *Diabetes*. 2014;63(7):2188-95.
53. Cryer PE. Glucose counterregulation: prevention and correction of hypoglycemia in humans. *The American journal of physiology*. 1993;264(2 Pt 1):E149-55.
54. Gerich J, Davis J, Lorenzi M, Rizza R, Bohannon N, Karam J, et al. Hormonal mechanisms of recovery from insulin-induced hypoglycemia in man. *The American journal of physiology*. 1979;236(4):E380-5.
55. Garber AJ, Cryer PE, Santiago JV, Haymond MW, Pagliara AS, Kipnis DM. The role of adrenergic mechanisms in the substrate and hormonal response to insulin-induced hypoglycemia in man. *The Journal of clinical investigation*. 1976;58(1):7-15.
56. Dagogo-Jack SE, Craft S, Cryer PE. Hypoglycemia-associated autonomic failure in insulin-dependent diabetes mellitus. Recent antecedent hypoglycemia reduces autonomic responses to, symptoms of, and defense against subsequent hypoglycemia. *The Journal of clinical investigation*. 1993;91(3):819-28.
57. Fukuda M, Tanaka A, Tahara Y, Ikegami H, Yamamoto Y, Kumahara Y, et al. Correlation between minimal secretory capacity of pancreatic beta-cells and stability of diabetic control. *Diabetes*. 1988;37(1):81-8.
58. Tominaga M, Maruyama H, Vasko MR, Baetens D, Orci L, Unger RH. Morphologic and functional changes in sympathetic nerve relationships with pancreatic alpha-cells after destruction of beta-cells in rats. *Diabetes*. 1987;36(3):365-73.
59. Rawlings R, Yuan L, Shi H, Brehm W, Pop-Busui R, Nelson P. Dynamic Stress Factor (DySF): A Significant Predictor of Severe Hypoglycemic Events in Children with Type 1 Diabetes. *Journal of diabetes & metabolism*. 2012;3:177.

60. Unger RH, Orci L. Paracrinology of islets and the paracrinopathy of diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(37):16009-12.
61. Young A, Denaro M. Roles of amylin in diabetes and in regulation of nutrient load. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif). 1998;14(6):524-7.
62. Kolterman OG, Schwartz S, Corder C, Levy B, Klaff L, Peterson J, et al. Effect of 14 days' subcutaneous administration of the human amylin analogue, pramlintide (AC137), on an intravenous insulin challenge and response to a standard liquid meal in patients with IDDM. *Diabetologia*. 1996;39(4):492-9.
63. Fineman MS, Koda JE, Shen LZ, Strobel SA, Maggs DG, Weyer C, et al. The human amylin analog, pramlintide, corrects postprandial hyperglucagonemia in patients with type 1 diabetes. *Metabolism: clinical and experimental*. 2002;51(5):636-41.
64. Fineman M, Weyer C, Maggs DG, Strobel S, Kolterman OG. The human amylin analog, pramlintide, reduces postprandial hyperglucagonemia in patients with type 2 diabetes mellitus. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2002;34(9):504-8.
65. Thompson RG, Peterson J, Gottlieb A, Mullane J. Effects of pramlintide, an analog of human amylin, on plasma glucose profiles in patients with IDDM: results of a multicenter trial. *Diabetes*. 1997;46(4):632-6.
66. Whitehouse F, Kruger DF, Fineman M, Shen L, Ruggles JA, Maggs DG, et al. A randomized study and open-label extension evaluating the long-term efficacy of pramlintide as an adjunct to insulin therapy in type 1 diabetes. *Diabetes care*. 2002;25(4):724-30.
67. Lee NJ, Norris SL, Thakurta S. Efficacy and Harms of the Hypoglycemic Agent Pramlintide in Diabetes Mellitus. *Annals of Family Medicine*. 2010;8(6):542-9.
68. Marrero DG, Crean J, Zhang B, Kellmeyer T, Gloster M, Herrmann K, et al. Effect of adjunctive pramlintide treatment on treatment satisfaction in patients with type 1 diabetes. *Diabetes care*. 2007;30(2):210-6.
69. Ceriello A, Piconi L, Quagliaro L, Wang Y, Schnabel CA, Ruggles JA, et al. Effects of pramlintide on postprandial glucose excursions and measures of oxidative stress in patients with type 1 diabetes. *Diabetes care*. 2005;28(3):632-7.
70. Hoogwerf BJ, Doshi KB, Diab D. Pramlintide, the synthetic analogue of amylin: physiology, pathophysiology, and effects on glycemic control, body weight, and selected biomarkers of vascular risk. *Vascular Health and Risk Management*. 2008;4(2):355-62.
71. Ratner RE, Dickey R, Fineman M, Maggs DG, Shen L, Strobel SA, et al. Amylin replacement with pramlintide as an adjunct to insulin therapy improves long-term glycaemic and weight control in Type 1 diabetes mellitus: a 1-year, randomized controlled trial. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2004;21(11):1204-12.
72. Eissele R, Goke R, Willemer S, Harthus HP, Vermeer H, Arnold R, et al. Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *European journal of clinical investigation*. 1992;22(4):283-91.
73. Vilsboll T, Agerso H, Krarup T, Holst JJ. Similar elimination rates of glucagon-like peptide-1 in obese type 2 diabetic patients and healthy subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(1):220-4.
74. Flint A, Raben A, Astrup A, Holst JJ. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(3):515-20.
75. Nikolaidis LA, Mankad S, Sokos GG, Miske G, Shah A, Elahi D, et al. Effects of glucagon-like peptide-1 in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction after successful reperfusion. *Circulation*. 2004;109(8):962-5.
76. Sokos GG, Nikolaidis LA, Mankad S, Elahi D, Shannon RP. Glucagon-like peptide-1 infusion improves left ventricular ejection fraction and functional status in patients with chronic heart failure. *Journal of cardiac failure*. 2006;12(9):694-9.

77. Bose AK, Mocanu MM, Carr RD, Brand CL, Yellon DM. Glucagon-like peptide 1 can directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury. *Diabetes*. 2005;54(1):146-51.
78. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2015: A Patient-Centered Approach: Update to a Position Statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes care*. 2015;38(1):140-9.
79. (CHMP) CfMPfHU. Summary of opinion: Suliqua European Medicines Agency.: European Medicines Agency.; 2016 [cited 2016 10/11/2016]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Summary_of_opinion_-_Initial_authorisation/human/004243/WC500216058.pdf.
80. Agency EM. SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS Xultophy, INN-insulin degludec/liraglutide 2016 [Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002647/WC500177657.pdf.
81. Nordisk N. Novo Nordisk receives FDA Approval for Xultophy® 100/3.6 (insulin degludec and liraglutide injection). 2016 [
82. U.S. SA. Sanofi receives FDA approval of Soliqua 100/33 for the treatment of adults with type 2 diabetes 2016 [Available from: <http://www.news.sanofi.us/2016-11-21-Sanofi-Receives-FDA-Approval-of-Soliqua-100-33-for-the-Treatment-of-Adults-with-Type-2-Diabetes>.
83. Zander M, Madsbad S, Madsen JL, Holst JJ. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet (London, England)*. 2002;359(9309):824-30.
84. Zhang J, Tokui Y, Yamagata K, Kozawa J, Sayama K, Iwahashi H, et al. Continuous stimulation of human glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in a mouse model (NOD) delays onset of autoimmune type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2007;50(9):1900-9.
85. Sherry NA, Chen W, Kushner JA, Glandt M, Tang Q, Tsai S, et al. Exendin-4 improves reversal of diabetes in NOD mice treated with anti-CD3 monoclonal antibody by enhancing recovery of beta-cells. *Endocrinology*. 2007;148(11):5136-44.
86. Gutniak M, Orskov C, Holst JJ, Ahren B, Efendic S. Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *The New England journal of medicine*. 1992;326(20):1316-22.
87. Dupre J, Behme MT, Hramiak IM, McFarlane P, Williamson MP, Zabel P, et al. Glucagon-like peptide I reduces postprandial glycemic excursions in IDDM. *Diabetes*. 1995;44(6):626-30.
88. Dupre J, Behme MT, Hramiak IM, McDonald TJ. Subcutaneous glucagon-like peptide I combined with insulin normalizes postcibal glycemic excursions in IDDM. *Diabetes care*. 1997;20(3):381-4.
89. Behme MT, Dupré J, McDonald TJ. Glucagon-like peptide 1 improved glycemic control in type 1 diabetes. *BMC Endocrine Disorders*. 2003;3:3.
90. Hedbacker K, Birsoy K, Wysocki RW, Asilmaz E, Ahima RS, Farooqi IS, et al. Antidiabetic effects of IGFBP2, a leptin-regulated gene. *Cell metabolism*. 2010;11(1):11-22.
91. Wang MY, Chen L, Clark GO, Lee Y, Stevens RD, Ilkayeva OR, et al. Leptin therapy in insulin-deficient type I diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(11):4813-9.
92. Yu X, Park BH, Wang MY, Wang ZV, Unger RH. Making insulin-deficient type 1 diabetic rodents thrive without insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(37):14070-5.
93. Xu Y, Chang JT, Myers MG, Jr., Xu Y, Tong Q. Euglycemia Restoration by Central Leptin in Type 1 Diabetes Requires STAT3 Signaling but Not Fast-Acting Neurotransmitter Release. *Diabetes*. 2016;65(4):1040-9.

94. Fujikawa T, Chuang JC, Sakata I, Ramadori G, Coppari R. Leptin therapy improves insulin-deficient type 1 diabetes by CNS-dependent mechanisms in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(40):17391-6.
95. Larsen J, Brekke M, Sandvik L, Arnesen H, Hanssen KF, Dahl-Jorgensen K. Silent coronary atheromatosis in type 1 diabetic patients and its relation to long-term glycemic control. *Diabetes*. 2002;51(8):2637-41.
96. de Ferranti SD, de Boer IH, Fonseca V, Fox CS, Golden SH, Lavie CJ, et al. Type 1 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association and American Diabetes Association. *Diabetes care*. 2014;37(10):2843-63.
97. Brand CL, Rolin B, Jorgensen PN, Svendsen I, Kristensen JS, Holst JJ. Immunoneutralization of endogenous glucagon with monoclonal glucagon antibody normalizes hyperglycaemia in moderately streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*. 1994;37(10):985-93.
98. Sorensen H, Brand CL, Neschen S, Holst JJ, Fosgerau K, Nishimura E, et al. Immunoneutralization of endogenous glucagon reduces hepatic glucose output and improves long-term glycemic control in diabetic ob/ob mice. *Diabetes*. 2006;55(10):2843-8.
99. Okamoto H, Kim J, Aglione J, Lee J, Cavino K, Na E, et al. Glucagon Receptor Blockade With a Human Antibody Normalizes Blood Glucose in Diabetic Mice and Monkeys. *Endocrinology*. 2015;156(8):2781-94.
100. Wang MY, Yan H, Shi Z, Evans MR, Yu X, Lee Y, et al. Glucagon receptor antibody completely suppresses type 1 diabetes phenotype without insulin by disrupting a novel diabetogenic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(8):2503-8.
101. Mu J, Qureshi SA, Brady EJ, Muise ES, Candelore MR, Jiang G, et al. Anti-Diabetic Efficacy and Impact on Amino Acid Metabolism of GRA1, a Novel Small-Molecule Glucagon Receptor Antagonist. *PLoS ONE*. 2012;7(11).
102. Petersen KF, Sullivan JT. Effects of a novel glucagon receptor antagonist (Bay 27-9955) on glucagon-stimulated glucose production in humans. *Diabetologia*. 2001;44(11):2018-24.
103. Guan HP, Yang X, Lu K, Wang SP, Castro-Perez JM, Previs S, et al. Glucagon receptor antagonism induces increased cholesterol absorption. *Journal of Lipid Research*. 2015;56(11):2183-95.
104. Gelling RW, Du XQ, Dichmann DS, Romer J, Huang H, Cui L, et al. Lower blood glucose, hyperglucagonemia, and pancreatic alpha cell hyperplasia in glucagon receptor knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(3):1438-43.
105. Karimian N, Qin T, Liang T, Osundiji M, Huang Y, Teich T, et al. Somatostatin receptor type 2 antagonism improves glucagon counterregulation in biobreeding diabetic rats. *Diabetes*. 2013;62(8):2968-77.
106. Christensen M, Calanna S, Sparre-Ulrich AH, Kristensen PL, Rosenkilde MM, Faber J, et al. Glucose-dependent insulintropic polypeptide augments glucagon responses to hypoglycemia in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2015;64(1):72-8.
107. LaGamma EF, Kirtok N, Chan O, Nankova BB. Partial blockade of nicotinic acetylcholine receptors improves the counterregulatory response to hypoglycemia in recurrently hypoglycemic rats. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2014;307(7):E580-8.
108. El-Khatib FH, Russell SJ, Nathan DM, Sutherland RG, Damiano ER. A bihormonal closed-loop artificial pancreas for type 1 diabetes. *Science translational medicine*. 2010;2(27):27ra.
109. El-Khatib FH, Russell SJ, Magyar KL, Sinha M, McKeon K, Nathan DM, et al. Autonomous and continuous adaptation of a bihormonal bionic pancreas in adults and adolescents with type 1 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(5):1701-11.

110. Caputo N, Jackson MA, Castle JR, El Youssef J, Bakhtiani PA, Bergstrom CP, et al. Biochemical stabilization of glucagon at alkaline pH. *Diabetes technology & therapeutics*. 2014;16(11):747-58.
111. Haidar A, Legault L, Messier V, Mitre TM, Leroux C, Rabasa-Lhoret R. Comparison of dual-hormone artificial pancreas, single-hormone artificial pancreas, and conventional insulin pump therapy for glycaemic control in patients with type 1 diabetes: an open-label randomised controlled crossover trial. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 3(1):17-26.
112. Newswanger B, Ammons S, Phadnis N, Ward WK, Castle J, Campbell RW, et al. Development of a Highly Stable, Nonaqueous Glucagon Formulation for Delivery via Infusion Pump Systems. *Journal of diabetes science and technology*. 2015;9(1):24-33.
113. Bakhtiani PA, El Youssef J, Duell AK, Branigan DL, Jacobs PG, Lasarev MR, et al. Factors affecting the success of glucagon delivered during an automated closed-loop system in type 1 diabetes. *Journal of diabetes and its complications*. 2015;29(1):93-8.
114. Haidar A, Legault L, Dallaire M, Alkhateeb A, Coriati A, Messier V, et al. Glucose-responsive insulin and glucagon delivery (dual-hormone artificial pancreas) in adults with type 1 diabetes: a randomized crossover controlled trial. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2013;185(4):297-305.
115. Caputo N, Castle JR, Bergstrom CP, Carroll JM, Bakhtiani PA, Jackson MA, et al. Mechanisms of glucagon degradation at alkaline pH. *Peptides*. 2013;45:40-7.
116. Russell SJ, El-Khatib FH, Sinha M, Magyar KL, McKeon K, Goergen LG, et al. Outpatient glycemic control with a bionic pancreas in type 1 diabetes. *The New England journal of medicine*. 2014;371(4):313-25.
117. Haidar A, Duval C, Legault L, Rabasa-Lhoret R. Pharmacokinetics of Insulin Aspart and Glucagon in Type 1 Diabetes during Closed-Loop Operation. *Journal of diabetes science and technology*. 2013;7(6):1507-12.
118. Haidar A, Farid D, St-Yves A, Messier V, Chen V, Xing D, et al. Post-breakfast closed-loop glucose control is improved when accompanied with carbohydrate-matching bolus compared to weight-dependent bolus. *Diabetes & metabolism*. 2014;40(3):211-4.
119. El Youssef J, Castle JR, Bakhtiani PA, Haidar A, Branigan DL, Breen M, et al. Quantification of the glycemic response to microdoses of subcutaneous glucagon at varying insulin levels. *Diabetes care*. 2014;37(11):3054-60.
120. Farhy LS, McCall AL. Optimizing reduction in basal hyperglucagonaemia to repair defective glucagon counterregulation in insulin deficiency. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2011;13 Suppl 1:133-43.
121. Farhy LS, Du Z, Zeng Q, Veldhuis PP, Johnson ML, Brayman KL, et al. Amplification of pulsatile glucagon counterregulation by switch-off of alpha-cell-suppressing signals in streptozotocin-treated rats. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2008;295(3):E575-85.
122. Farhy LS, Chan A, Breton MD, Anderson SM, Kovatchev BP, McCall AL. Association of Basal Hyperglucagonemia with Impaired Glucagon Counterregulation in Type 1 Diabetes. *Frontiers in physiology*. 2012;3.
123. Farhy LS, McCall AL. Models of glucagon secretion, their application to the analysis of the defects in glucagon counterregulation and potential extension to approximate glucagon action. *Journal of diabetes science and technology*. 2010;4(6):1345-56.
124. Farhy LS, McCall AL. System-level control to optimize glucagon counterregulation by switch-off of alpha-cell suppressing signals in beta-cell deficiency. *Journal of diabetes science and technology*. 2009;3(1):21-33.
125. Cryer PE. Hypoglycaemia: the limiting factor in the glycaemic management of Type I and Type II diabetes. *Diabetologia*. 2002;45(7):937-48.